



پایان نامه کارشناسی ارشد (M.Sc.) در رشته بیوتکنولوژی پزشکی

موضوع

تهیه آنتی بادی مونوکلونال بر علیه آنتی ژن نو ترکیب nmp22

اساتید راهنما

دکتر محمدجوادریسا

دکتر محمدساروخانی

استاد مشاور

دکتر ملیحه پاک نژاد

نگارش

مهسا فقیهی

چکیده:

مقدمه:

nmp22 عضو از خانواده فیلامنت‌های حدواسط هست. Nmp22 عضو از خانواده سیتوکراتین‌ها با وزن مولکولی ۲۴۰ کیلو دالتون است که در بسیاری از سرطان‌ها از جمله سرطان‌ها، پستان، کولون، سرطان ریه و پروستات بیان می‌شود. هدف از انجام این مطالعه تولید آنتی‌بادی مونوکلونال بر علیه nmp22 است.

روش:

به منظور ایمنیزاسیون از دو موش بالبیسی ماده ۶ تا ۸ هفته استفاده گردید. آنتی‌ژن مورد استفاده پروتئین نوترکیب nmp22 بود. تزریقات اولیه و دو تزریق یادآور بعدی بصورت داخل صفاقی و آخرین تزریق به صورت داخل وریدی انجام شد. پس از ایمنیزاسیون سلول‌های طحال موش و سلول‌های Sp2/0 با استفاده از پلی اتیلن گلیکول با یکدیگر ادغام شدند. از بین ۱۳۵ کلون که سوپرناتانت آن‌ها با پروتئین نوترکیب nmp22 واکنش مثبت داشتند تنها هشت کلون مترشح پایدار دارای آنتی‌بادی با تیترا بالا انتخاب و دو بار رقیق سازی حد برای این کلون‌ها انجام شد. ترشح کلون‌ها بوسیله الیزای غیرمستقیم بررسی شد. با استفاده از کیت شرکت Roche کلاس و زیرکلاس آنتی‌بادی تعیین شد. به منظور تخلیص آنتی‌بادی‌ها ابتدا پروتئین‌های موجود در سوپرناتانت هیبریدوما با آمونیوم سولفات ۵۰٪ رسوب داده شد، سپس با ستون افینیتی کروماتوگرافی پروتئین G- تخلیص گردید. افینیتی این آنتی‌بادی به روش Beatty و همکاران سنجیده شد. واکنش دهندگی آنتی‌بادی با بافت توموری مثانه و تعدادی از رده‌های سلولی (MCF-7, HepG2 MDAMB468, A431, HN5) با وسترن بلات انجام شد.

نتایج:

در بین ۱۳۵ کلون مترشحه آنتی‌بادی، تنها ترشح هشت کلون پایدار بود. این کلون دوبار رقیق‌سازی حد شد. آنتی‌بادی حاصل دارای کلاس و زیر کلاس IgG بوده و زنجیره سبک آن از نوع کاپا (k) می‌باشد. افینیتی برای پروتئین نوترکیب nmp22 معادل 1×10^7 M محاسبه گردید. نتایج حاصل از وسترن بلات بافت توموری مثانه و رده‌های سلولی نشان‌دهنده حضور ۲ باند اصلی در ناحیه ۴۰ کیلو دالتون و ۵۵ کیلو دالتون بود.

کلمات کلیدی: آنتی‌بادی مونوکلونال؛ nmp22